

استخدام السلالات السريعة و البطيئة من *Lactococcus lactis ssp cremoris* في إسرار أنصاج الجبن الشبيه بالآوشاري* 1- عزل سلالات الطافرات البطيئة والسلالات السريعة وتحديد طرزها الوراثية

عامر طالب توفيق

عامر حميد سعيد الدهان

قسم الصناعات الغذائية والتقانات الاحيائية

كلية الزراعة - جامعة بغداد

المستخلص

درس تأثير عمليات النقل والتنشيط المستمرين في الحليب والأوساط M17 و Glucose M17 (GM17) و مرق الاكتيك (LB) والحضن بدرجة الحرارة المحددة للنمو في حث الطافرات البطيئة الفاقدة لقدرة إنتاج إنزيمات البروتينازات (Pro-) والطافرات الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز (Lac-) للسلالة *Lactococcus lactis ssp cremoris* CH-1. وقورنت قابليات خفض الرقم الهيدروجيني وتأخير الحليب ومقدار الارتفاع بالعدد الحي في المزارع المستخرجة والقدرة على تحطيم بروتينات الحليب ذات الوزن الجزيئي العالي وتأيض اللاكتوز لكل من السلالات السريعة وسلالات الطافرات البطيئة والتي تم عزلها من السلالة الأصلية CH-1 لتحديد طرزها الوراثية. لوحظت قابلية عالية للسلالة CH-1 تحت الدراسة على فقدان صفة إنتاج إنزيمات البروتينازات وتكوين الطافرات البطيئة (الفاقدة لقدرة إنتاج إنزيمات البروتينازات Pro-) ذاتيا نتيجة لعمليات النقل والتنشيط المستمرة في الأوساط المستخدمة في الدراسة، وأن تلك الطافرات تمتلك القدرة على تأيض اللاكتوز (تمتلك الطراز الوراثي Lac+Pro-)، في حين لا تكون السلالة الأصلية CH-1 طافرات ذاتية فاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز، وأن نموها في درجة الحرارة المحددة للنمو (38 م لمدة 18 ساعة) قد أدى إلى تكوين طافرات فاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز (Lac-)، تشير هذه النتائج إلى أن صفتي إنتاج إنزيمات البروتينازات (Pro+) وتأيض اللاكتوز (Lac+) محمولتان على بلازميدين مختلفين في السلالة الأصلية CH-1، وأن البلازميد الحامل للصفة إنتاج إنزيمات البروتينازات (Pro+) يفقد ذاتيا بينما يفقد البلازميد الحامل لصفة تأيض اللاكتوز (Lac+) بتأثير الحرارة المحددة للنمو.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 107 – 124, 2005

Tawfik & Al-Dahhan

USE OF SLOW AND FAST STRAINS OF *Lactococcus lactis ssp cremoris* CH-1 IN ACCELERATING OF AUSHARY CHEESE RIPENING 1-ISOLATION OF FAST AND SLOW STRAINS WITH DETERMINATION OF ITS PHENOTYPES

A. T. Tawfik

A. Al- Dahan

College of Agriculture – University of Baghdad

Department of Food Sciences and Biotechnology

ABSTRACT

Successive transfer in milk, M17, glucose M17 (GM17) and lactic broth (LB) were used to induce slow mutant from the parent strain of *Lactococcus lactis ssp cremoris* CH-1, the incubation on the restrictive elevated temperature were used to induce lactose deficient mutant from the same strain. The slow mutant (Pro-) was isolated using the FSDA medium and lactose deficient mutant (Lac-) was isolated in lactic indicator agar (LIA). A study to compare the characteristics of fast milk coagulation ability, the level of viable count in coagulated milk culture, increasing nonprotein nitrogen level in the culture and lactose utilization ability between the isolated mutants and fast strains derived from the same parent strain were conducted. The results showed that the strain under study have grate ability to induce slow mutant spontaneously and these mutants ferment lactose (Lac+Pro-). The proteinase enzyme production and lactose fermentation ability seemed to be encoded by two separated plasmids. The plasmid which carry the Pro+ lost spontaneously while the Lac+ plasmid lost by growing in elevated temperature.

* تاريخ استلام البحث 2004/6/13 ، تاريخ قبول البحث 2005/2/28

• ممثل من رسالة ماجستير للباحث الأول

(*)Part of M Sc. Thesis for the first author.

المقدمة

يعرف البادئ الجيد بأن له القدرة على إنتاج حامض اللاكتيك بكميات ملائمة وبمعدلات ثابتة خلال مدة استعماله . وعندما لا تكون له القدرة على ذلك يصبح بطيئاً في إنتاج الحامض مما يؤثر في العملية التصنيعية (5) .

ونعد صفة إنتاج الحامض بشكل سريع من قبل بكتيريا *Lactococci* من الصفات غير الثابتة في مزارعها (29) ، إذ تحتوي السلالة النقية المفردة على خلايا لا تستطيع تخثير الحليب إلا بشكل بطيء جداً عند نموها فيه (15، 19) . وقد يعمل معدل وجودها في البادئ إلى نسبة 1 - 2% من المجموع الكلي لخلايا المزرعة (3) . لذلك فإن مزرعة البادئ تكون غير متجانسة في تركيبها لاحتوائها على خلايا الطافرات البطيئة والخلايا السريعة ، ولا تظهر المزرعة صفة البطيء في تخثير الحليب إلا عندما تتراكم الطافرات البطيئة فيها بمرور الوقت بشكل يجعل نسبتها من مجموع الخلايا المزرعة أكبر من نسبة الخلايا السريعة الأصلية (14) ونعد عمليات النقل والتشيط و الحفظ المستمرة من أهم العوامل التي تؤدي إلى زيادة تراكم الطافرات البطيئة على حساب الخلايا السريعة الأصلية (24) .

عسرف Huggins و Sandine (18) خلايا *Lactococci* السريعة بأنها تمتلك القدرة على خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب إلى مستوى التخثر عند الحضان لمدة 16 ساعة بدرجة 21 م أو لمدة 6 ساعات بدرجة 30 م . وقد أكد Lawrence (14) أن خلايا البطيئة في تخثير الحليب تمتلك نفس فعالية الخلايا السريعة في إنتاج حامض اللاكتيك إلا أن تخثير الحليب في مزارعها يكون متأخراً بسبب قلة كثافتها العددية مقارنة بمزارع الخلايا السريعة عند الحضان في الظروف نفسها فهي لاتصل إلا إلى 25 % مما تصل إليها الإعداد الحية في مزارع الخلايا السريعة ولكن إنتاج الحامض في مزارعها يستمر بغياب التضاعف إلى أن يصل إلى مستوى تخثير حليب المزرعة .

تؤكد الدراسات (22 ، 24) على أن بكتيريا *Lactococci* تمتلك نظاماً إنزيمياً متسللاً للبروتين مكوناً من إنزيمات البروتينيزات والليبازات يعمل على تحويل بروتينات الحليب إلى ببتيدات قصيرة السلسلة وحوامض أمينية حرة تستطيع البكتيريا استهلاكها بشكل مباشر . إن عدم قدرة خلايا الطافرات

البطيئة النمو في الحليب والوصول إلى العدد نفسه الذي تصل إليه السلالة الأصلية في الظروف نفسها وعلاقة ذلك بعدم قدرة تلك الطافرات على رفع نسبة النيتروجين الذائب في الحليب خلال نموها فيه يشير إلى فقدان فعالية ذلك النظام الأنزيمي (12 ، 22 ، 24) . كما إن عدم ثبات صفة تكوين البروتينيزات في البكتيريا وظهور الطافرات البطيئة الفاقدة لقدرة إنتاج تلك اللانزيمات (Pro-) بشكل مفاجئ وبتردد عالٍ وبطريقة غير قابلة للرجوع وإمكانية زيادة ظهور تلك الطافرات بتتابع طرائق الشفاء البلازمي Plasmid curing كالتنمية في درجات حرارية محسنة للنمو وإستعمال صبغة الاكريدن يشير بشكل قاطع إلى أن تلك الصفة يشفر لها وراثياً بواسطة البلازميدات (6) ، (23) . كما أجريت العديد من الدراسات باستخدام طرائق الهندسة الوراثية الحديثة من أجل تثبيت الصفات الصناعية المهمة في البادئ وبطريقة غير قابلة للفقدان (4 ، 25 ، 30 ، 37) .

طرائق العمل

أولاً - الأوساط الزراعية :- استخدم وسط M17 كما وصف Terzaghi و Sandine (35) و وسط Glucose M17 (GM17) الذي يحتوي على المكونات نفسها للوسط M17 عند استبدال اللاكتوز 5% بالكوكوز 5% (10) ، تنمية السلالة الأصلية و طافراتها البطيئة وفي تجارب منحنى النمو ووقت الجيل .

وأستعمل وسط أكار اللاكتيك (LA) ووسط مرق اللاكتيك (LB) ويسمى أيضاً وسط Elliker لحساب العدد الحي في البادئ وفي مزارع السلالة الأصلية و طافراتها (Lac+Pro- و Lac-Pro-) وفي تجارب منحنى النمو ووقت الجيل (1) .

وأستعمل وسط أكار دليل اللاكتيك (LIA) كما وصف McKay وجماعته (19) لعزل الطافرات الفاقدة لقدرة تأييض اللاكتوز (Lac-) إذ تكون تلك الطافرات على هذا الوسط مستعمرات بيضاء غير محاطة بهالة صفراء ، بينما تكون المستعمرات القادرة على تأييض اللاكتوز (Lac-) مستعمرات صفراء أكبر قطراً من مستعمرات Lac- محاطة بهالة صفراء .

وأستعمل وسط الاكسار التفريقي السريع البطيء (FSDA) لعزل الطافرات البطيئة من السلالة الأصلية وكذلك لتمييز الأنواع السريعة (Lac+Pro+) عن الطافرات البطيئة (Lac+Pro-) .

إنخفاض الرقم الهيدروجيني إلى 3 أو أقل يدل على نشاط مثالي للمزرعة . وقد تم حساب العدد الحسي في مزارع الحليب المتخثرة باستخدام التخفيف الملائمة وطريقة الصب بالأطباق في وسط LA .

3 - القابلية على تحليل بروتينات الحليب :- استخدمت طريقة Hull وكما وصفها Sample وجماعته (27) . كما تم إعداد منحنى التآزر والقياسي للتعرف على مقدار النيتروجين الذائب في المزارع تحت الفحص ونمط تحليل بروتينات الحليب خلال وقت الحضانة لعزلات الطافرات البطيئة والعزلات السريعة .

4 - قابلية تأيض اللاكتوز :- جرى كما ذكره Steenson و Klaenhammer (32) .

رابعاً - منحنى النمو ووقت الجيل :- لقيح الوسط المستعمل بمقدار 1% من مزرعة بعمر 18 ساعة منماة في الوسط نفسه ، وعند استعمال الحليب كوسط يتم تتبع تطور الحموضة فيه بقياس مقدار الانخفاض في الرقم الهيدروجيني . وحسب العدد الحي خلال وقت الحضانة للتعرف على منحنى النمو ووقت الجيل (31) .

خامساً - النمو في الحليب المدعم بمهضوم الكازين :- أخذت نمو مزارع سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 بوجود 1% و 3% و 5% من مهضوم الكازين في الحليب باستعمال 2% من المزارع المتخثرة للسلالات المنتخبة والحضانة بدرجة 35 م لمدة 5 ساعات ، بعد صفر و 2 و 5 ساعات من الحضانة تم سحب 5 مل من كل قينة يستخدم 1 مل منها لحساب العدد الحسي و 4 مل لقياس الرقم الهيدروجيني ، واستعمل حليب ملقح غير مضاف له مهضوم الكازين كتحريية مقارنة ، كما لقحت المزرعة اللاصليبة بنسبة 2% وأجري عليها نفس الفحص كتجربة مقارنة أخرى .

سادساً - التحري عن الطافرات الذاتية الفاسدة لصدرة تأيض اللاكتوز في السلالة الأصلية CH-1 :-

استخدمت طريقة McKay وجماعته (19) .

سابعاً - عزل طافرات Lac- المحدثة بالحرارة

المحددة للنمو من السلالة الأصلية CH-1 :-

لتحديد درجة الحرارة المحددة لنمو السلالة

الأصلية تم تلقيح أنابيب حاوية على LB بنسبة

2% من مزارع LB للسلالة الأصلية ، حضانة

الأنابيب الملقحة بدرجات الحرارة 35 و 38

حيث تكون مستعمرات الطافرات البطيئة على هذا الوسط ذات قطر يتراوح بين 0.2-0.5 ملم ، شفافة ومسطحة غير حاوية على لون أصفر ولا تحاط بهالة صفراء

بينما تكون المستعمرات السريعة ذات قطر يتراوح بين 1-3 ملم ذات لون أبيض مائل للاصفرار لماع سطحها محدب محاطة بهالة صفراء إزاء خلفية اللون لالزرق للوسط (18) . واستعمل وسط حليب بروموكريسول الأرجواني (BCP-M) في اختبارات فحص الفعالية والوقت الأدنى لتخثير الحليب

لكل من السلالات السريعة والطافرات البطيئة المعزولة من السلالة الأصلية (1) . وأستخدمت طريقتي الزرع الصب بالأطباق والتلقيح السطحي في تجارب منحنى النمو وعزل الطافرات البطيئة (16)

ثانياً - عزل الطافرات البطيئة :- استخدمت طريقة النقل والتنشيط المتعاقب ثم الحضانة بدرجة حرارة التلاجة (4 م) في الحليب والأوساط التركيبية M17 و GM17 و LB للسلالة الأصلية CH-1 لحث الطافرات البطيئة ذاتياً . واستعملت المزارع الأخيرة (السادسة في حالة استخدام الحليب الفرز كوسط والعاشرة في حالة استعمال الأوساط التركيبية) لعزل الطافرات البطيئة على وسط FSDA (18) . بعد الحضانة إنتخبت 26 و 20 مستعمرة تعطي الصفات المظهرية للطافرات البطيئة من أطباق وسط FSDA الخاصة بمزارع الحليب الفرز والأوساط التركيبية الثلاث على التوالي وفي الوقت نفسه إنتخبت 11 مستعمرة تعطي الصفات المظهرية للخلايا السريعة من أطباق FSDA الخاصة بمزارع الحليب الفرز لأجراء الفحوص التأكيدية ودراسة خواصها .

نقلت كل المستعمرات المنتخبة إلى قناني تحتوي على 5 مل من وسط BCP-M وحضنت بدرجة 30 م إلى أن تم الحصول على نخثر متجانس للحليب .

ثالثاً - تشخيص ودراسة خواص عزلات الطافرات البطيئة والعزلات السريعة :-

1- الوقت الأدنى لتخثير الحليب :- أجري الفحص كما وصفه Huggins و Sandine (18) ، وعرفت المزارع البطيئة بأنها تلك التي لا تستطيع تخثير الحليب عند حضانها لمدة 16 ساعة بدرجة 20 م أو عند حضانها لمدة 8 ساعات بدرجة 30 م .

2- فحص الفعالية :- تم كما في (29) ، عين مقدار الحموضة المتطورة بقياس الرقم الهيدروجيني النهائي للمزرعة .

المزارع . إن إحتواء الأوساط التركيبية على مركبات نايتروجينية جاهزة للاستهلاك بشكل حوامض أمينية حرة و ببتيدات قصيرة السلسلة قد يشجع بشكل غير مباشر فقدان صفة Pro+ في هذه السلالة ، إذ يعمل وجود مثل تلك المواد على منع أو تثبيط تخليق البروتينيزات فضلا على تأثير عمليات النقل والتشيط التي تشجع فقدان البلازميدات التي تشفر لتلك اللازيمات ومن ثم فقدان تلك الصفة (7 ، 34) .

تشير هذه النتائج إلى أن السلالة تحت الدراسة تميل بشكل كبير إلى فقدان صفة إنتاج إنزيمات البروتينيزات Pro+ ذاتها خلال عمليات النقل والتشيط والحفظ باستعمال الحليب والأوساط M17 و GM17 و LB والمستملة بشكل واسع في تربية بكتريا البادئ .

ثانيا- بعض خواص مزارع عزلات الطافرات البطيئة مقارنة بمزارع العزلات السريعة :-

الوقت الأدنى لتخثير الحليب:- تظهر الجداول (1 و 2 و 3 و 4 و 5) الوقت الذي تستغرقه العزلات البطيئة والسريعة لتخثير حليب مزارعها ، ويلاحظ أن مزارع الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية استغرقت 20 - 48 ساعة لتغير لون الدليل (خض الرقم الهيدروجيني للمزرعة من 6.7 إلى 5.4) و 28 - 72 ساعة لتخثير حليب المزرعة (4.7 pH) عند الحضان بدرجة 30 م ، في حين استغرقت 22 - 48 م ساعة لتغير لون الدليل و 39 - أكثر من 72 ساعة لتخثير حليب المزرعة عند الحضان بدرجة 20 م (جدول 1) . أما مزارع الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الأوساط M17 و GM17 و LB للسلالة الأصلية فقد استغرقت 18 ساعة لتغير لون الدليل و 24 ساعة لتخثير الحليب عند حضانها بدرجة 30 م واستغرقت 38 ساعة لتغير لون الدليل و 24 ساعة لتخثير حليب المزرعة عند حضانها بدرجة 20 م (الجدول 2 و 3 و 4) تعد درجتى 20 م و 30 م الحد الأدنى والاعلى الأمثل لنمو وتضاعف سلالات بكتريا Mesophilic Lactococci (33) وقد استطاعت العزلات السريعة إحداث التخثر الحامضي في الحليب خلال 7.5 ساعة بدرجة 30 م (جدول 5) ، بينما احتاجت عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية 4 - 10 أضعاف تلك المدة (28 - 72 ساعة) (جدول 1) ، كما استغرقت عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الأوساط M17 و GM17 و LB للسلالة الأصلية 5 - 10 أضعاف تلك المدة (39 - 72 ساعة) (الجدول 2

و 40 لمدة 18 ساعة تم حساب العدد الحي قبل وبعد الحضان في وسط LA وعزلت طافرات Lac- من مزرعة السلالة الأصلية كما فسي (21) وسميت عزلة الطافرة هذه بالسلالة ALac-I .

النتائج والمناقشة

أولا- تراكم الطافرات البطيئة فسي مزارع السلالة الأصلية :-

تراكمت الطافرات البطيئة في مزارع السلالة الأصلية المنمأة على الحليب كوسط زرعى خلال عمليات النقل والتشيط ثم الخزن المتتالي ، إذ لوحظ عدم قدرة المزارع المنشطة من الثقبتين الخامسة والسادسة على تخثير الحليب بعد تلقيحه بنسبة 1% وحضنه بدرجة 20 م لمدة 18 ساعة . وباستعمال وسط FSDA ظهر أن الطافرات البطيئة في تلك المزارع قد بلغت نسبة 85.26% من المجموع الكلي للخلايا فيها ، مما يدل على أن إجراء عمليات النقل والتشيط والخزن لسنت مرات متتالية قد أظهر وجود تلك الطافرات بشكل واضح . وإن ارتفاع مستوى تلك الطافرات فسي المزارع إلى هذا الحد قد أكسب تلك المزارع صفات المزرعة البطيئة على الرغم من احتوائها نسبة 14.74% خلايا سريعة والتي يمكن أن تجهز الطافرات البطيئة بالحوامض الأمينية الأساسية لنموها . أوضح Hugenholtz وجماعته (17) أن مزرعة بادئ السلالات Wg2 و E8 لبكتريا *Lactococcus lactis ssp cremoris* تعطى صفات المزرعة السريعة رغم احتوائها على 92% من خلاياها بشكل طافرات بطيئة ، لذلك لا تظهر مزرعة البادئ صفة البطيء في تخثير الحليب حتى وإن احتوت على نسبة مرتفعة من الطافرات البطيئة من مجموع خلاياها وذلك بسبب وجود الخلايا السريعة فيها ولكن في اللحظة التي لا تستطيع فيها الخلايا السريعة سد حاجتها وحاجسة الطافرات البطيئة من الحوامض الأمينية الجاهزة ، فإن تلك المزرعة سوف تظهر البطيء في صفة تخثير الحليب . ولمعرفة تأثير اختلاف وسط النمو في عملية تراكم الطافرات البطيئة في مزارع السلالة الأصلية ، أجريت عمليات النقل والتشيط والخزن المتتالية فسي الأوساط M17 و GM17 و LB لعشر نقلات متتالية . عند الفحص عن وجود الطافرات البطيئة فسي مزارع النقلة العاشرة للأوساط الثلاثة باستعمال الوسط FSDA وجد أن جميع خلايا المزارع قد تحولت 100% إلى طافرات بطيئة ولم تظهر مستعمرات تعطي الصفات المظهرية للخلايا السريعة فسي جميع

و 3 و 4) واستطاعت مزارع العزلات السريعة إعدادات التخثر الحامضي في مزرعة الحليب خلال 20 ساعة عند حفظها بدرجة 20 م ، بينما تطلبت مزارع الطافرات البطيئة المعزولة مسن مزارع الحليب و

الأوساط التركيبية الثلاث للسلالة الأصلية 2- 3.5 أضعاف تلك الوقت لإحداث التأثير نفسه (24 ساعة) (الجداول 1 و 2 و 3 و 4 و 5) . يرجع سبب ذلك إلى فقدانها لإنتاج إنزيمات البروتيازات (14 ، 26) .

جدول 1. بعض خصائص مزارع عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية عند نموها في الحليب القوي (4) .

رقم العزلة	الوقت بالساعات لتغير لون الكاشف بدرجة		الوقت بالساعات لتخثر حليب المزرعة بدرجة		PH النهائي	العند الحي في المزرعة المتخثرة (8^10)	ميكروغرام تايرومين/ مل مسن حليب المزرعة (3)
	20 م	30 م	20 م	30 م			
1	20	22	28	39	6.30	1.82	21.05
2	20	22	28	39	6.33	0.97	23.2
3	20	22	28	40	6.51	1.60	18.0
4	20	22	28	39	6.33	1.91	*14.29
5	20	22	28	39	6.42	*1.99	17.52
6	20	22	28	39	6.40	1.42	19.41
7	20	22	28	39	*6.58	0.85	16.94
8	48	48	72	أكثر من 72	6.29	1.82	20.0
9	48	48	72	أكثر من 72	6.42	0.89	18.58
10	22	22	28	أكثر من 72	6.20	1.06	20.58
11	22	48	28	39	6.35	1.92	19.41
12	22	24	28	39	6.21	1.33	22.11
13	22	24	28	39	6.25	0.86	21.77
14	40	48	72	أكثر من 72	6.32	1.04	17.29
15	40	48	72	أكثر من 72	6.38	1.9	15.64
16	40	48	72	أكثر من 72	6.43	*0.49	17.05
17	22	24	28	أكثر من 72	6.22	1.42	15.52
18	22	24	28	39	6.27	1.58	16.47
19	22	24	28	48	6.36	0.99	16.32
20	22	40	28	39	6.30	1.82	19.17
21	22	40	28	48	6.21	1.44	20.58
22	22	40	28	48	6.25	1.51	14.42
23	22	48	28	72	6.51	1.30	19.52
24	22	24	28	39	* 5.15	1.62	21.17
25	22	24	28	39	6.52	1.80	*23.29
26	22	24	28	39	6.35	0.80	14.58

(1) الرقم الهيدروجيني بعد تلقح الحليب بمقدار 2% والحض بدرجة 35 م لمدة 5 ساعات (pH الحليب قبل الحض 6.70 - 6.80)

(2) تلقح الحليب بمقدار 1 % وحض بدرجة 30 م حتى الحصول على التخثر في المزرعة .

(3) مزرعة منقصة بمقدار 1% وحض بدرجة 30 م حتى التخثر ثم بقدر التايروسين بطريقة Hull .

(4) كل العزلات تستهلك اللاكتوز عند تدميرها على وسط LIA ، فهي تمتلك الطراز الوراثي Lac-Pro- .

(*) تشير إلى أعلى وأقل قيمة .

الأوساط M17 و GM17 و LB بين 0.42 - 0.64 و 0.42 - 1.1 و 0.37 - 0.71 على التوالي (جدول 2 و 3 و 4) وهذا يشير إلى أن مزارع العزلات البطيئة المعزولة من السلالة الأصلية تتأخر كثيرا عن مزارع العزلات السريعة في زيادة تراكم الحامض خلال فحص الفعالية (13) .

2 - فحص الفعالية :- تراوح مقدار التغير في الرقم الهيدروجيني لمزارع حليب العزلات السريعة عند فحص الفعالية بين 1.65 - 2.1 ، في حين كان في مزارع العزلات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية يتراوح بين 0.17 - 0.60 (جدول 1 و 5) في حين كان في مزارع حليب العزلات البطيئة المعزولة من مزارع

جدول 2. بعض خصائص عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الوسط M17 للسلائل الأصلية عند نموها في الحليب الفريز (4) .

رقم العزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة		الوقت اللازم بالساعات لتختبر حليب المزرعة بدرجة		(1) PH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة رحدة مكونة للمستعمرة / مل (10^8)	(3) مايكرو غرام / تايرو سين / مل من حليب المزرعة
	20 م	30 م	20 م	30 م			
1	38	18	42	24	6.11 *	1.32	18
2	38	18	42	24	6.23	1.45	15.76
3	38	18	42	24	6.25	1.81	17.52
4	38	18	42	24	6.23	0.97	15.29
5	38	18	42	24	6.20	0.94	16.94
6	38	18	42	24	6.21	1.15	16.0
7	38	18	42	24	6.23	1.15	15.88
8	38	18	42	24	6.22	0.89 *	14.81 *
9	38	18	42	24	6.25	1.3	17.05
10	38	18	42	24	6.30 *	1.1	15.64
11	38	18	42	24	6.33	1.35	17.41
12	38	18	42	24	6.13	1.21	15.52
13	38	18	42	24	6.25	1.32	21.05
14	38	18	42	24	6.21	1.43	19.78
15	38	18	42	24	6.20	1.91	19.41
16	38	18	42	24	6.27	1.21	17.71
17	38	18	42	24	6.23	1.89 *	21.05
18	38	18	42	24	6.22	1.10	22.23
19	38	18	42	24	6.28	1.85	15.88
20	38	18	42	24	6.28	0.99	22.82 *

(1) و (2) و (3) و (4) كما في جدول (1)

3 - العدد الحي في مزرعة الحليب المتخثرة :- اسم تصل الكثافة العددية في مزارع الحليب المتخثرة لعزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية إلا إلى 17-26% من كثافتها في مزارع العزلات السريعة (الجدول 1 و 5) . وبلغت في مزارع الحليب المتخثرة لعزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع اللاوساط M17 و GM17 و LB للسلالة الأصلية 25-31% و 25-34% و 27-34% من الكثافة العددية في المزارع المتخثرة للعزلات السريعة (الجدول 2 و 3 و 4 و 5) . إن الكثافة العددية في مزارع حليب الطافرات البطيئة لا تزيد عن 20 - 25% من تلك التي تصلها الخلايا السريعة لنفس

السلالة عند نموها في الحليب (14) و إن تخثير الحليب في مزارع الطافرات البطيئة يتأخر عن مزارع العزلات السريعة نتيجة لانخفاض العسدد الكلي فيها ، إلا إن إنتاج الحامض في مزارع الطافرات البطيئة يستمر بغياب النضاعف عند تسديد فترة الحضانة إلى أن يتم خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب إلى مستوى التخثر (2 ، 34) .

4- قابلية تحليل بروتينات الحليب :- استطاعت العزلات السريعة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية رفع مستوى النيستروجين غير البروتيني (مقدر بالتايروسين) إلى 86.47 - 104.94 مايكرو غرام / مل عند حضنها في

جدول 3. بعض خصائص عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الوسط GM17 للسلالة الأصلية عند نموها في الحليب الفريز (4) .

رقم عزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون التدليل بدرجة		الوقت اللازم بالساعات لتحثير حليب المزرعة بدرجة		(1) pH النهائي نقص الفعالية	(2) العدد النقي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة للمسحرة /مل (10^8)	(3) مايكرو غرام ميكرو غرام تايزوسين/ مل من حليب المزرعة
	20 م	30 م	20 م	30 م			
					5.65*		ال
1	38	18	42	20	5.71	1.81	21.76
2	38	18	42	20	5.95	1.80	18.47
3	38	18	42	20	5.78	1.63	19.41
4	38	18	42	20	6.05	1.53	22.58
5	38	18	42	20	6.07	1.44	21.52
6	38	18	42	20	6.19	1.80	19.88
7	38	18	42	20	6.08	1.0	21.88
8	38	18	42	20	5.90	1.41	* 16
9	38	18	42	20	6.1	1.34	18.95
10	38	18	42	20	5.97	1.91	17.05
11	38	18	42	20	6.03	1.33	* 22.82
12	38	18	42	20	6.22	1.90	15.88
13	38	18	42	20	6.33*	0.79*	17.05
14	38	18	42	20	6.26	1.21	17.41
15	38	18	42	20	6.09	1.11	21.52
16	38	18	42	20	6.17	1.45	20.58
17	38	18	42	20	5.98	1.89	17.88
18	38	18	42	20	6.10	1.01	17.05
19	38	18	42	20	6.23	1.92	17.47
20	38	18	42	20		1.53	19.52

(1) و (2) و (3) و (4) كما في جدول (1)

البروتينيزات سوف تنخفض كثافتها العديدة عن تلك التي تصل لها الخلايا السريعة عند نموها في الحليب وتقل سرعتها في خفض الرقم الهيدروجيني لتخثير الحليب (26) . تمتلك بكتريا Lactococci عدداً من إنزيمات البروتينيزات والبيبتيديزات التي لها القدرة على تحليل بروتينات الحليب ذات الأوزان الجزيئية العالية لتحويلها إلى حوامض أمينية حرة وتعد تلك الإنزيمات الحجر الأساس في عملية إنتاج الجبن (8 ، 36) .

5 - قابلية تأيض اللاكتوز :- أظهر اختبار تأيض اللاكتوز لمزارع عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الحليب والأوساط التركيبية الثلاث للسلالة الأصلية ، أن جميع تلك المزارع تمتلك القدرة على تأيض اللاكتوز عند

الحليب (الجدول 5) ، في حين لم تستطع عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية زيادة كميته إلا بنسبة بلغت 16-22% من تلك الموجودة في مزارع العزلات السريعة (جدول 1) أما العزلات البطيئة المعزولة من مزارع اللاوساط M17 و GM17 و LB للسلالة الأصلية فلم تصل إلا إلى نسبة 17-21% و 16-21% و 17-21% على التوالي من تلك الموجودة في مزارع العزلات السريعة (الجدول 2 و 3 و 4) .

أشار Citti وجماعته (3) إلى أن قابلية تحليل البروتينيات التي يمتلكها خلايا السلالة الأصلية تزيد بأربعة أضعاف على قابلية تحليل البروتينات للطافرات البطيئة التي تم عزلها من نفس السلالة الأصلية . ونتيجة لفقدان الطافرات البطيئة إنزيمات

جدول 4. بعض خصائص عزلات الطافرات البطينية المعزولة من مزارع الوسط LB للسلاسل الأصلية عند نموها في الحليب القز (4) .

رقم العزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة		الوقت اللازم بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة		pH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة للمستعمرة مل / (10^8)	(3) مايكروغرام تايروسين / مل من حليب المزرعة
	20 م	30 م	20 م	30 م			
1	36	18	40	24	6.07	1.63	15.79
2	36	18	40	24	6.05	* 2.10	21.17
3	36	18	40	24	6.05	2	22.11
4	36	18	40	24	* 6.63	1.50	17.14
5	36	18	40	24	6.27	1.65	18.58
6	36	18	40	24	6.32	1.43	19.41
7	36	18	40	24	6.33	1.47	* 14.51
8	367	18	40	24	6.38	1.25	16.70
9	36	18	40	24	6.15	1.67	15.88
10	36	18	40	24	6.15	1.58	* 22.81
11	36	18	40	24	6.10	1.22	16.82
12	36	18	40	24	6.35	* 0.97	16.91
13	36	18	40	24	* 6.04	1.01	19.17
14	36	18	40	24	6.21	1.52	17.88
15	36	18	40	24	6.04	1.77	17.53
16	36	18	40	24	6.07	1.08	18.47
17	36	18	40	24	6.19	1.95	18.47
18	36	18	40	24	6.09	1.05	17.88
19	36	18	40	24	6.11	1.18	19.41
20	36	18	40	24	6.09	1.89	21.05

(1) و (2) و (3) و (4) كما في الجدول (1)

جدول 5. بعض خصائص العزلات السريعة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية عند تنميتها في الحليب القز (4) .

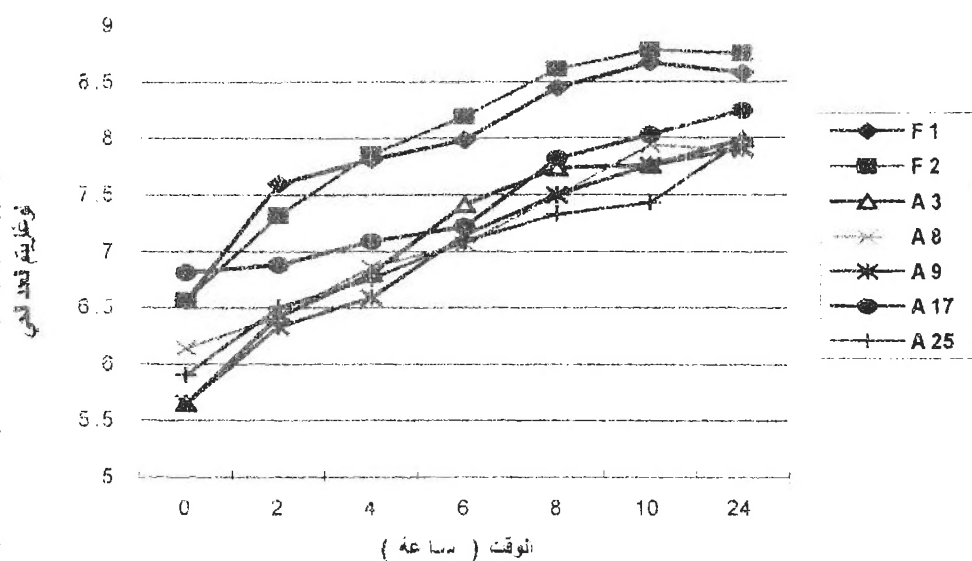
رقم المزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة		الوقت اللازم بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة		pH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة للمستعمرة /مل (10^8)	(3) مايكروغرام تايروسين / مل من حليب المزرعة
	20 م	30 م	20 م	30 م			
1	6	16	20	7.5	5.01	* 2.79	* 86.47
2	6	16	20	7.5	4.94	4.85	95.88
3	5.5	16	20	7.5	* 4.65	5.5	* 104.94
4	6	16	20	7.5	4.90	* 7.55	94.23
5	5.5	16	20	7.5	5	6.81	97.88
6	5.5	16	20	7.5	* 5.10	3.75	93.52
7	5.5	16	20	7.5	4.84	5.42	104.11
8	5.6	16	20	7.5	4.92	4.31	89.05
9	5.5	16	20	7.5	4.95	4.22	95.64
10	5.5	16	20	7.5	4.99	5.65	93.76
11	5.5	16	20	7.5	4.67	6.35	100.35

(1) و (2) و (3) و (4) كما في الجدول (1)

و A9 و A17 و A25 والسلاسل السريعة F1 و F2 المنتخبة في الحليب ، ويظهر نمو سلاسل الطافرات البطيئة متخلفا عن نمو السلاسل السريعة خلال مدة الحضان وكان العدد الأولي في مزارع السلاسل السريعة أكثر منه في مزارع سلاسل الطافرات البطيئة بمقدار 2.5-5 أضعاف رغم استعمال نسبة التلقيح نفسها لكل المزارع الداخلة في التجارب ، ويرجع سبب ذلك إلى انخفاض العدد الكلي في المزارع المتخلفة لسلاسل الطافرات البطيئة عنسبه في مزارع السلاسل السريعة (11 ، 34) . كان النمو لكل سلاسل الطافرات البطيئة أواخر يتما رغم عدم امتلاكها إنزيمات البروتيناز ويرجع سبب ذلك إلى احتواء الحليب على نسبة 0.01 % من بروتينات بشكل نتروجين ذات فضل على أن عمليات التعقيم التي تجري على الحليب تعمل على رفع تلك النسبة (11 ، 14) . إن انخفاض العدد الحي في بداية النمو يقلل من حدة التنافس بحيث يمكن للخلايا الاعتماد على تلك النسبة للتضاعف والنمو ولا تظهر عندها أهمية إنزيمات البروتيناز . استمرت هذه الحالة لسلاسل الطافرات البطيئة تحت الدراسة لمدة عشر ساعات بعد التلقيح والحضان وتنتج عنه الطور اللوغاريتمي لهذه السلاسل . وفي اللحظة التي ينخفض فيها النتروجين الجاهز نتيجة لزيادة أعداد الخلايا في المزرعة فيصبح هو العامل المحدد للنمو إذ يستهلك بشكل تناقصي ونتيجة لذلك سيكبح نمو السلاسل البطيئة ، فيصبح عدم امتلاك البروتيناز مفتاح النمو والتضاعف لذلك تدخل السلاسل البطيئة طور الثبوت (34) .

تتميزها في وسط LIA (الجداول 1 و 2 و 3 و 4) ، حيث لم تحتوي أي مزرعة من تلك المزارع على أية مستعمرات تظهر الصفات الخاصة بطافرات Lac- . أي أن عمليات النقل والتشيط المستمرة في الحليب والأوساط الثلاث لا تؤثر على فقدان هذه الصفة (12،9) . إن الاختلافات الكبيرة الواضحة بين عزلات الطافرات البطيئة والعزلات السريعة في قابلية خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب وارتفاع مستوى النتروجين الذائب فيه والقدرة على تأيض اللاكتوز في وسط LIA والاختلاف بمستويات الكثافة العددية في المزارع المتخلفة يشير إلى أن جميع عزلات الطافرات البطيئة التي تم انتخابها تمتلك الطراز الوراثي Lac+Pro- (10، 32) ، مما يدل على عدم ارتباط الصفات وراثيا في هذه السلالة ومن المحتمل أن تكون كل صفة منمولة على بلازميد يختلف في صفاته عن بلازميد الصفة الأخرى كما تشير هذه النتائج إلى أن عمليات النقل والتشيط المستمرة والحفظ بدرجة حرارة الثلاجة في كل من الحليب والأوساط التركيبية الثلاث أدت دورا مهما في فقدان البلازميد المشفر لصفة Pro+ ، وأن تلك العملية لا تؤثر في البلازميد السذي يشفر للصفة Lac+ (12، 24) . أنتخبت العزلات البطيئة المرفقة 3 و 8 و 9 و 17 و 25 والمعزولة من مزارع الحليب الفرز (الجدول 1) واعتبرت سلاسل بطيئة فاقدة القدرة إنتاج البروتينات ورسر لها A3 و A8 و A9 و A17 و A25 كم أنتخبت العزلات السريعة المرفقة 1 و 2 و سميت السلاسل F1 و F2 وذلك لإجراء بقية الدراسة عليها (الجدول 5) .

ثالثا - منحني النمو ووقت الجيل ونمط انخفاض الرقم الهيدروجيني في الحليب :- يظهر الشكل (1) منحني نمو سلاسل الطافرات البطيئة A3 و A8

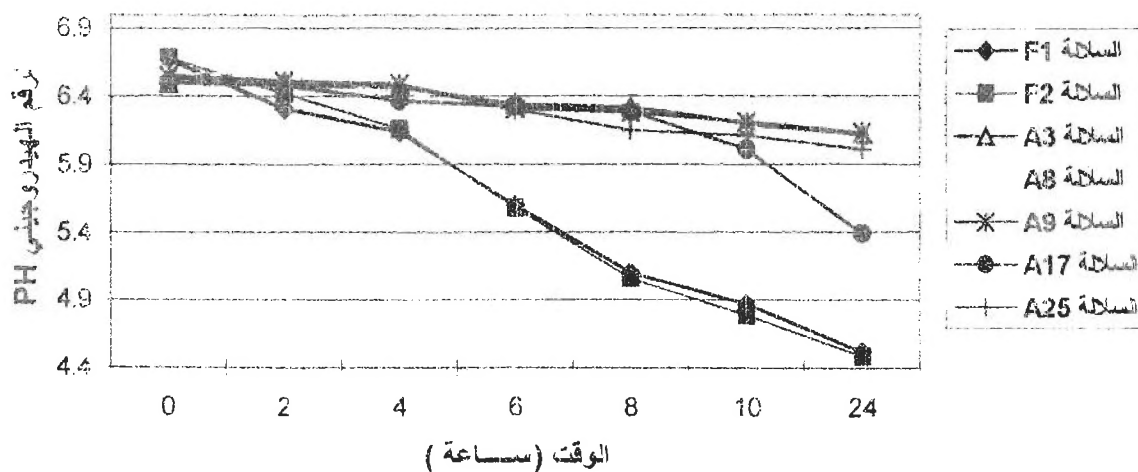


شكل 1. منحني النمو للسلاسل السريعة F1 و F2 وسلاسل الطافرات البطيئة A1 و A2 و A8 و A17 و A25 في الحليب الفرز خلال 24 ساعة بدرجة 30 م .

التحلل البروتيني متوفرة في الوسط . وعندما تكون عملية تجهيز هذه المنتجات أكبر من استهلاكها من قبل الخلايا ، يكون النمو لوجاريميا ومن ثم لاتعد عملية توفر المصدر النيتروجيني العامل المحدد للنمو في المزرعة . بينما في مزارع سلالات الطافرات البطيئة لاتكون منتجات التحلل البروتيني العامل المحدد للنمو عندما يكون عدد الخلايا قليلا . حيث تستطيع تلك الخلايا الاعتماد على النيتروجين غير السبروتيني الموجود في الحليب . ولكن زيادة أعداد الخلايا البطيئة في المزرعة لا يصاحبها زيادة في منتجات التحلل البروتيني ، مما يجعل عملية استهلاك المصدر النيتروجيني أكبر من عملية ترأكم منتجات التحلل النيتروجيني ، مما يؤدي زيادة التنافس على المصدر النيتروجيني ليكون هو العامل المحدد للنمو في مزرعة الحليب بسبب نقصه أثناء معالجة

يظهر منحنى نمو السلالة A17 تسأثير زيادة العدد الأولي (وقت الصفر) في نمط نمو السلالات البطيئة تحت الدراسة إذ تم التلقيح بنسبة 4% لرفع كثافة العدد الأولي في مزارع تلك السلالات إلى 8.5 ضعفا عما هو عليه في بقية السلالات البطيئة فلم تمتلك هذه السلالة منحنى نمو موازيا لمنحنى نمو السلالات البطيئة والسريعة ولكن الزيادة بالعدد الحي كانت متدرجة ولم يظهر فيها النمو اللوجاريمى كما هو في بقية السلالات البطيئة حتى تصل نقطة تكون موازية لمنحنى نمو بقية سلالات الطافرات البطيئة لتقطع وقتا قصيرا في انطور اللوجاريمى (2 ساعة) مقارنة بالوقت الذي تقطعه بقية سلالات الطافرات البطيئة لتدخل معها طور الثبوت . أشار Thomas و Mills (34) إلى أن زيادة الكثافة العددية في مزارع السلالات السريعة باستمرار يؤدي بشكل غير مباشر إلى زيادة تركيز إنزيمات البروتينازات لذلك سوف تكون منتجات

شكل 2. الانخفاض بالرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب الفرز خلال 24 ساعة بدرجة 30 م للسلالات السريعة F1 و F2 و سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 .



الهيدروجيني في مزرعة الحليب الفرز عند تنمية عزلات السلالات السريعة F1 و F2 و سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 فيه إذ أفرق منحنى الانخفاض في قيمة الرقم الهيدروجيني للسلالات السريعة عنه في سلالات الطافرات البطيئة

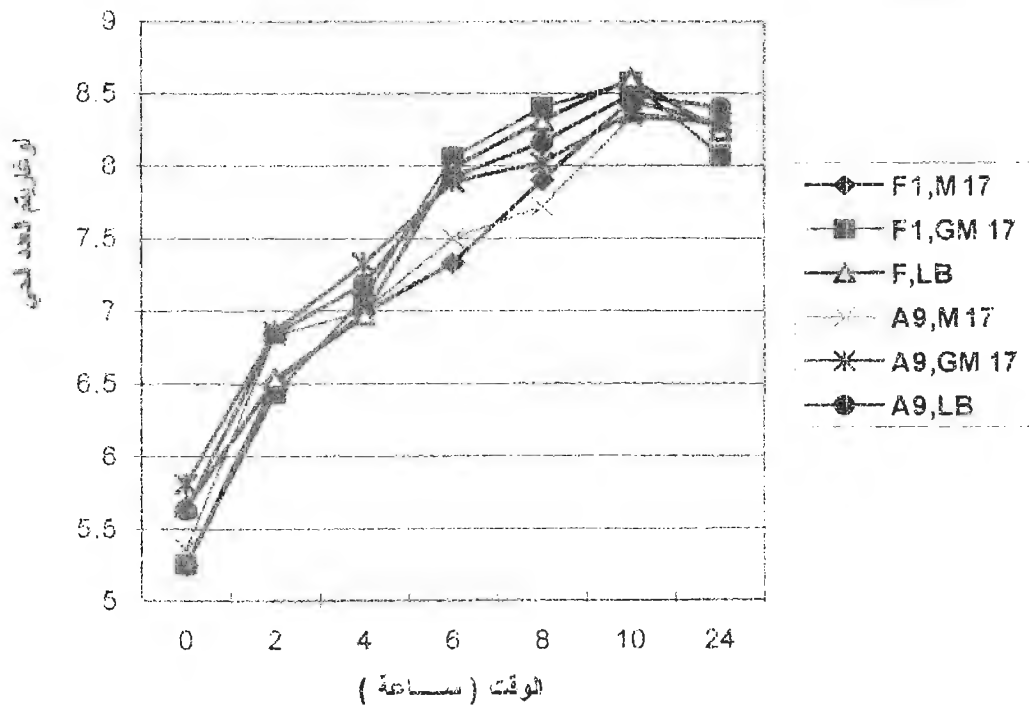
الحضن ، إمتلك السلالتين السريعة F1 و F2 وقت جيل مقداره 114 و 84 دقيقة على التوالي كما كان وقت الجيل للسلالات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 82 و 101 و 92 و 99 و 126 دقيقة على التوالي . يظهر الشكل (2) نمط انخفاض الرقم

0.58 و 0.42 و 1.11 و 0.52 على التوالي ، تشير هذه النتائج إلى عدم وجود علاقة بين عملية إنتاج الحامض والتضاعف في السلالات تحت الدراسة وأن الكثافة العددية للمزرعة هي التي تتحكم بخطر انخفاض الرقم الهيدروجيني (2 ، 3) .

رابعا - منحني النمو ووقت الجيل في الأوساط التركيبية :- تم تنمية سلالات الطافرة البطيئة A9 والسلالة السريعة F1 على الأوساط التركيبية M17 و GM17 و LB التعرف على تأثير نوع المصدر الكربوني على طبيعة نمو تلك السلالتين في الأوساط التركيبية ، وكما يظهر في الشكل (3) كانت المنحنيات متوازية مع بعضها،

بعد مرور أربع ساعات من الحضان ، إذ بلغت الكثافة العددية في مزارع السلالات السريعة في تلك الوقت إلى عشرة أضعاف مقارنة بمزارع سلالات الطافرات البطيئة ، ففي هذا الوقت كان مقدار التغير في قيمة pH مزارع السلالات السريعة F1 ، F2 ، 0.56 و 0.52 على التوالي في حين كان بمقدار 0.02 و 0.02 و 0.04 و 0.02 لسلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 على التوالي . وبعد مرور 24 ساعة من الحضان أصبح مقدار التغير في قيمة الرقم الهيدروجيني للسلالات السريعة F1 و F2 2.15 و 2.19 على التوالي و لسلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 0.38 و

شكل رقم 3. منحني نمو السلالة السريعة F1 و سلالة الطافرة البطيئة A9 في الأوساط التركيبية الثلاث M17 و GM17 و LB خلال 24 ساعة بدرجة 30 م . ساعة بدرجة 30 م .



كلا السلالتين تمتلكان وقت جيل في وسط GM17 يقل عنه في وسطي M17 و LB وأن وقت الجيل في وسط LB لكلا السلالتين يقل عنه في وسط M17 ، قد يرجع سبب ذلك إلى سهولة استخدام الكلوكون كمصدر كربون من قبل هذه البكتيريا (19 ، 9) .

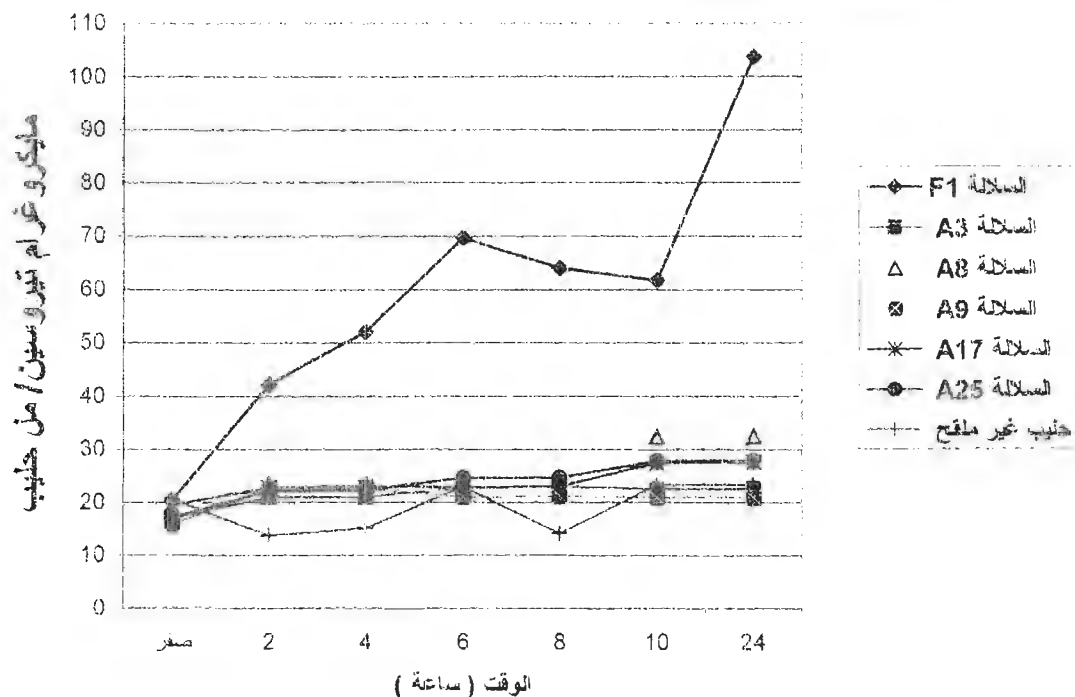
خامسا - نمط تحليل بروتينات الحليب خلال وقت الحضان :- يظهر الشكل (4) قدرة السلالة السريعة F1 على رفع مستوى النستروجين غير السبروتيني (الدائب) في الحليب عند النمو فيه لمدة 24 ساعة بدرجة 30 م . إذ زادت كميته بمقدار 31.76

وعلى الرغم من أن سلالة الطافرة A9 فاقدة لقدرة إنتاج البروتينيزات المرتبطة بالجدار الخلوي ، فإن الأوساط الثلاثة تدعم نمو كلا نوعي الخلايا Pro+ و Pro- وبالشكل الذي لا تتأثر فيه خلايا Pro- بالعطب الذي تحمله ، ويظهر أيضا من الشكل أن نمو كلا السلالتين لوزائريتين في الأوساط الثلاث . بلغ وقت الجيل للسلالة F1 في الأوساط M17 و GM17 و LB مقدار 78 و 44 و 49 دقيقة على التوالي ، وبلغ للسلالة A9 في الأوساط M17 و GM17 و LB مقدار 99 و 69 و 82 دقيقة على التوالي . ويلاحظ أن

السلالة السريعة F1 بعد أربع ساعات من الحضان .
ورصل مستواه إلى 103.76 مايكروغرام / مل من
المزرعة في السلالة F1 بعد مرور 24 ساعة في حين
للمستوى يصل إلا إلى

مايكروغرام تايروسين / مل، من الحليب بعد حضانها
لمدة أربع ساعات ، بينما لم تتمكن سلالات الطافرات
البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 من رفع
مستواه في الحليب إلا بنسبة 40% و 44% و 43%
و 42% على التوالي عما هو عليه في مزرعة

الشكل 4. نمط التحلل البروتيني في الحليب عند نمو السلالة السريعة F1 و F2 وسلالات الطافرات البطيئة A3 و
A8 و A9 و A17 و A25 فيه بدرجة 30 م لمدة 24 ساعة .



وقت الحضان عما هو عليه عند تنميتها في الحليب غير
المضاف له مهضوم الكازين ، يظهر ذلك تأثير إضافة
مهضوم الكازين في تدعيم نمو سلالات الطافرات
البطيئة ، كما انه يعطي تليلا إضافيا على إن تلك
السلالات تمتلك الطراز الوراثي Lac+ Pro- . فتؤثر
المصدر النيتروجيني جعل سلوكها في النمو وانتاج
الحامض مشابه لسلوك السلالة الأصلية . كما تظهر
النتائج في الجدول (6) عدم وجود تناسب طردي بين
نسبة مهضوم الكازين المضافة للحليب وبين الارتفاع
في العدد الحي في المزارع التي أضيف لها تركيز
أعلى من مهضوم الكازين ، فلم يوجد نمط معين من
الاختلاف بالكثافة العددية لسلالات الطافرات البطيئة
خلال وقت الحضان وكذلك في نمط إنتاج الحامض من
قبلها في المزارع التي تحتوي على تركيز أعلى من
مهضوم الكازين ، وسبب ذلك يرجع إلى أن التركيز
الاقول المستعمل في الدراسة (1%) قد يكون أكبر من

21% و 31% و 20% و 26% في مزارع
سلالات الطافرات البطيئة على التوالي من مستواه في
مزارع السلالة F1 . مما يشير إلى أن سلالات
الطافرات البطيئة فاقدة تماما لقدرة استعمال بروتينات
الحليب ذات الوزن الجزيئي العالي كمصدر نيتروجيني
(7 ، 12 ، 17) .

سادسا - تأثير تدعيم الحليب بمهضوم الكازين :-
يظهر الجدول (6) العدد الحي لمزارع سلالات
الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25
في الحليب والحليب المضاف له مهضوم الكازين
بثلاث تراكيز 1% و 3% و 5% وكذلك مقدار
الانخفاض بالرقم الهيدروجيني للمزارع خلال وقت
صفر و 2 و 5 ساعات من التلقيح والحضان ، ويبدو
إن إضافة مهضوم الكازين قد شجع نمو وانتاج
الحامض من قبل سلالات الطافرات البطيئة بشكل كبير
إذ انخفض الرقم الهيدروجيني وارتفع العدد الحي خلال

من ذلك إن إضافة مهضوم الكازين إلى الحليب المعد لتحضير البادئ الصناعي بمقدار 1% يجعل نمو سلالات الطافرات البطيئة تحت الدراسة مشابه لنمو السلالة الأصلية CH-1 ليسنى استخدام تلك السلالات البطيئة في الصناعة بشكل أوسع (26).

جدول 6. تأثير إضافة تراكيز مختلفة من مهضوم الكازين إلى الحليب في نمو السلالات البطيئة وتطور الرقم

الهيدروجيني خلال فحص الفعالية .

السلالة	وقت الحضانة ساعة	تركيز مهضوم الكازين المضاف إلى مزرعة الحليب						حليب غير مضاف له مهضوم الكازين	
		% 5		% 3		% 1			
		العدد الحي (6^10)	pH	العدد الحي (6^10)	pH	العدد الحي (6^10)	pH	العدد الحي (6^10)	pH
A 3	صفر	6.55	6.65	3.03	6.72	3.03	6.76	6.55	6.61
	2	45.2	5.45	38	5.99	72.5	6.08	9.75	6.39
	5	125	4.40	105	4.90	195	4.78	3.62	6.11
A 8	صفر	4.6	6.75	4.6	6.67	4.6	6.76	4.6	6.65
	2	11.7	5.27	13.1	5.55	15.4	5.65	10	6.41
	5	181	4.94	259	4.87	178	4.99	18	6.22
A 9	صفر	2.67	6.67	2.67	6.71	2.67	6.74	2.67	6.70
	2	16.7	5.85	91.5	5.67	54.5	6.01	9.75	6.53
	5	215	4.77	118	4.97	195	4.89	36.2	6.25
A 17	صفر	1.63	6.59	1.63	6.78	1.63	6.77	1.63	6.67
	2	19.7	5.03	16.6	5.76	14.1	5.80	17.7	6.25
	5	125	4.63	200	4.77	109	4.87	24	6.13
A 25	صفر	6.67	6.79	6.67	6.75	6.67	6.73	6.67	6.77
	2	62.5	5.65	30.8	5.47	58.5	5.63	10	6.42
	5	237	4.67	120	4.87	167	4.90	45	6.13
السلالة الأصلية CH-1	صفر	_____	_____	_____	_____	_____	_____	6.1	6.82
	2	_____	_____	_____	_____	_____	_____	141	5.70
	5	_____	_____	_____	_____	_____	_____	298	4.27

العدد الحي في مزارع LB للسلالة الأصلية عند تنميتها في درجات 35 م و 38 م و 40 م ويبدو منه واضحاً إن درجة 38 م هي التي تمتلك تأثيراً محدداً لنمو السلالة الأصلية تحت الدراسة *sablethl temperature* لذلك استخدمت في محاولات حبس طافرات Lac في مزارع LB للسلالة الأصلية . ويسعد تخطيط المزارع التي تم تنميتها بدرجة 38 م لمدة 18 ساعة على وسط LIA أمكن الحصول على أعداد كبيرة من المستعمرات التي تعطي

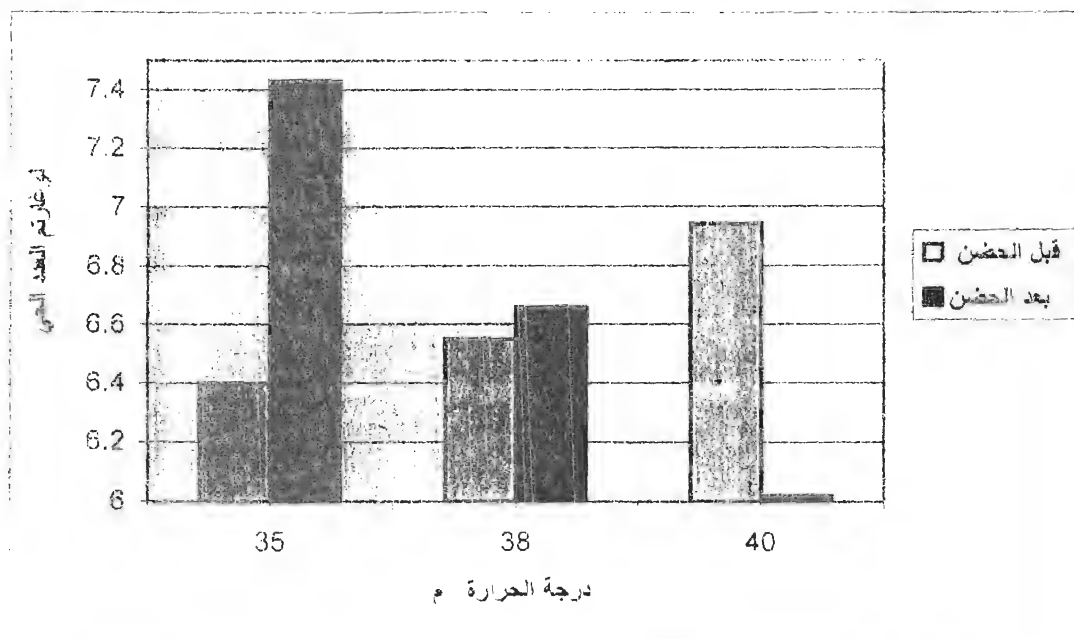
سابعاً - التحري عن وجود الطافرات الذاتية الفاقدة لقدرة تأييض اللاكتوز في السلالة الأصلية CH-1 :- تم التحري عن وجود الطافرات الذاتية الفاقدة لقدرة تأييض اللاكتوز في السلالة الأصلية بإستعمال 24 مزرعة حليب متخثرة جرى عنها فحص مأمجموعه 10996 مستعمرة معزولة على وسط LIA (18) ، وظهر أن السلالة تحت الدراسة لا تحوي على طافرات ذاتية فاقدة لقدرة تأييض اللاكتوز .

ثامناً - عزل طافرات Lac المحنة بالحرارة المحددة للنمو من السلالة الأصلية :- يظهر الشكل (5)

(13). أطلق على هذه العزلة اسم ALac-1.

الصفات المظهرية لمستعمرات طسافات Lac-

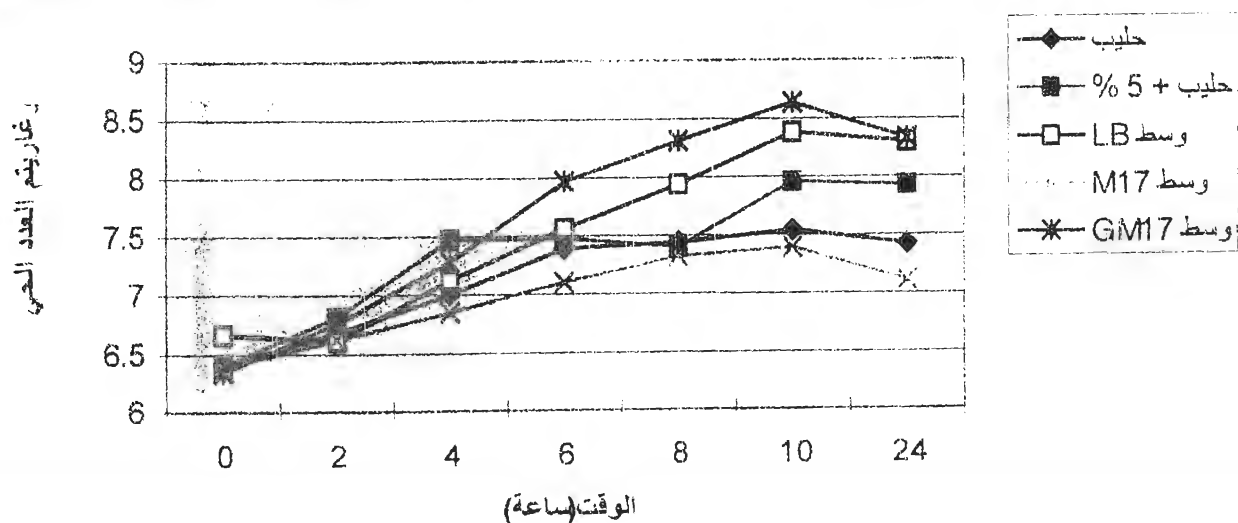
شكل 5. تأثير درجة الحرارة المحضن المرتفعة على نمو السلالة الأصلية CH-1 خلال 18 ساعة في وسط LB



السلالة تمتلك الطراز الوراثي Lac-Pro- فالسلالة فاقدة تماما لقدرة تأيض اللاكتوز ، ولكن إضافة الكلوكون يلغي تأثير عدم تأيض اللاكتوز من قبلها ، وفي هذه الحالة لو كانت السلالة مختنطة بقدرتها على إنتاج أنزيمات البروتينازات فإنها والحالة هذه لا بد أن

1 - - منحني نمو العزلة الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز في الحليب والحليب المضاف له 5% كلوكوز واللاوساط M17 و GM17 و LB: - يلاحظ من الشكل (6) ان منحني نمو السلالة ALac-1 في الحليب المدعم بالكلوكوز كان مرتفعا عن منحني نموها في الحليب . وأن نمط النمو هذا يشير إلى أن تلك

شكل 6. منحني نمو السلالة ALac-1 الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز في كل من الحليب والحليب المضاف له 5% كلوكوز و الأوساط التركيبية M17 و GM17 و LB لمدة 24 ساعة بدرجة 30 م .



موازيا له حتى الدخول في طور الثبوت ، وكان العدد الحي في مزارع LB متخفا عنه في مزارع GM17 بعد الساعة الرابعة من الحضان ، وكان وقت الجيل في وسط LB 84 دقيقة .

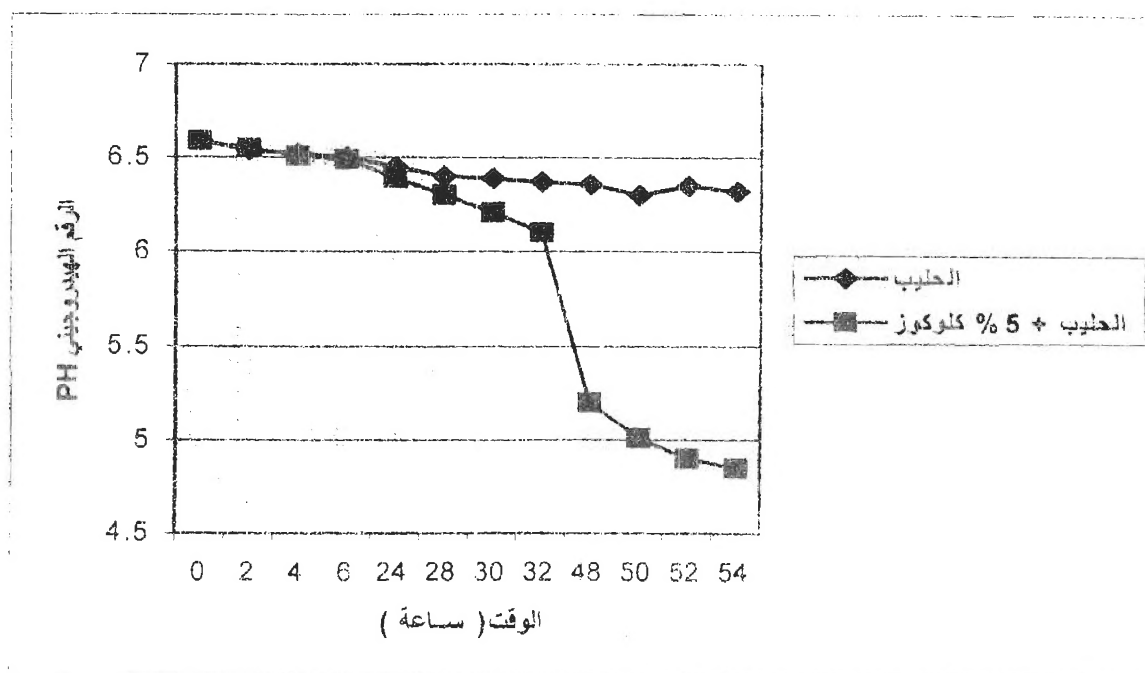
قد يرجع سبب تخلف منحني النمو اللوغاريتمي للسلالة Alac-1 في وسط LB عنه في وسط GM17 (رغم اختواء الوسطين على نفس النسبة من الكلوكوز) إلى السعة البفرية التي يوفرها وسط GM17 (35).

2 - إنخفاض الرقم الهيدروجيني في الحليب و الحليب المضاف له 5% كلوكوز :- يلاحظ من الشكل (7) انه لا يوجد فرق كبير بين قابلية السلالة Alac-1 على خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب والحليب المضاف له 5% كلوكوز حتى بعد مرور 24 - 28 ساعة وحضان بدرجة 30 م ، إذ بلغ 6.40 و 6.39 على التوالي ، وفي الوقت الذي يبلغ فيها لرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب 6.32 بعد مرور 54 ساعة من الحضان ، استمر الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب المضاف له 5% كلوكوز بالانخفاض إلا أنه لم يصل إلى مستوى تخثير حليب المزرعة إلا بعد مرور 40 - 48 ساعة من الحضان ، حيث أصبح الرقم الهيدروجيني 5.2 وبعد مرور 54 ساعة من الحضان إنخفض إلى 4.85 ، أن عدم إنخفاض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب المضاف له 5% كلوكوز عند تنمية السلالة Alac-1 فيه إلى مستوى التخثر بعد مرور 10 ساعات من الحضان بدرجة 30 م يشير إلى أن تلك الإنسافة لم تحفز نمو السلالة لتجعله مشابها لنمو السلالات السريعة ، وهذا دليل إضافي على أن السلالة Alac-1 تفقد أيضا قابلية إنتاج أنزيمات البروتينيز فهي تمتلك الطراز الوراثي Lac- Pro .

تشابه في نموها نمو السلالات السريعة في الحليب . لكن رغم ذلك استطاعت هذه السلالة زيـسـادة كثافتـها العددية في الحليب من 2.5×10^6 إلى 3.27×10^7 وحدة تكوين مستعمرة / مل بعد مرور 10 ساعات من التفقيح والحضان ، وقد يرجع ذلك إلى عملية الحمل caring over لوسط GM17 الذي أضيف مع اللقاح إلى مزرعة الحليب كما أن الحليب المستعمل في التـمـية يحتوي على مقدار من النيـسـتروجن غير البروتيني بشكل حوامض أمينية حرة وبيتيدات قصيرة السلسلة وعلى نسبة من الكلوكوز نتيجة للمعاملات الحرارية التي تعرض لها عند التعقيم مما يجعلها مصدرا سهلا للاستهلاك (11 ، 14) . كان وقت الجيل للسلالة Alac-1 في كل من الحليب والحليب المدعم بمقدار 5% كلوكوز 108 و 96 دقيقة على التوالي .

يظهر الشكل (6) أيضا أن نمو السلالة في وسط GM17 قد ارتفع بمقدار 2.75 ضعفا عنه في وسط M17 بعد مرور أربع ساعات وبمقدار 18 ضعفا بعد مرور 10 ساعات ، وهذا يشير بشكل واضح إلى عدم قدرة السلالة Alac-1 على تأييض اللاكتوز حيث يختلف وسطي M17 و GM17 عن بعضهما بنوع مصدر الكابون فأول يحتوي على اللاكتوز والثاني يحتوي على الكلوكوز . كان وقت الجيل لهذه السلالة في الوسطين 150 و 78 دقيقة على التوالي . أما في وسط LB فإن نمو السلالة كان متأخرا عن نموها في وسط GM17 ومتوقفا عنه في وسط M17 ، وفي جميع التجارب التي تم فيها استخدام وسط LB كان هناك طور ركود واضح استمر لمدة ساعتين ، دخلت بعد المزرعة الطور اللوغاريتمي الذي نغسابق مع الطور اللوغاريتمي لمنحني النمو في وسط GM17 لمدة ساعتين ثم انخفض عنه بعدها إلا أنه أصبح

شكل رقم 7. نمط انخفاض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب والحليب المضاف له 5% كلوكوز عند تنمية السلالة ALac-1 فيه



المصادر

1. Atlas, R.M. 1995. Hand Book of Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press, Inc., USA.
2. Breheng, S., M. Kanasaki, A. J. Jillier and G.R. Jago. 1975. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria .2-the uncoupling of acid production from growth. J.Dairy Sci. 30: 145.
3. Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker. 1965. Comparisons of slow and fast acid producing *S.lactis*. J.Dairy sci. 48:14
4. Davidson, B.E., R.M. Lianos, M.R. Cancilla and A. J. Hiller. 1995. Current research on genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. Int. Dairy J.5: 763.
5. Davies, J. G. 1965. Cheese. Basic Technology. Vol 1. J&A Churchall, Ltd., London.
6. Davis, F. L. and M. J. Gasson. 1981. Reviews of progress of dairy science: genetic of lactic acid bacteria. J.Dairy Res.48:363.
7. Exterkate, F. A. 1976. Proteolytic system of slow lactic acid producing variant of

- lactose fermentation in *S.lactis* NCDO1404. J. Dairy Sci. 68:572.
- 22.Pritchard, G.G. 1993. Physiology and biochemistry of proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 12:179.
 - 23.Ray, B. 2002. Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Inc., USA
 - 24.Reid, J.R., T. Coolbear and G.G. Pritchard. 1993 Properties of PIII type cell wall proteinase released by lysozyme treatment of *Lac. lactis* ssp *cremoris*: a comparative study. FEMS. Microbiol. Rev. Abst 12:p.69.D2.
 - 25.Renault, P.1996. Genetic engineering strategies in lactic acid bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. Bozoglu, T.F. and Ray, B., Eds. Springer, N.Y. USA. 1-35.
 - 26.Richardson, G. H., C. A Erston, Kim, J. M. and C. Daly. 1983. Protenase negative variants of *S.creamoris* of cheese starter. J. Dairy Sci. 66:2278.
 - 27.Samples, D. R., R. L. Richter and C. W. Dill. 1984. Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: comparison of Hull mthod and trinitrobenzen sulfuric acid procedure. J. Dairy Sci. 67: 60.
 - 28.Sandine, W. E., 1979. Bacteriophage for starter culture . In: Lactic Starter Technology. P. 42 – 47. Pfizer cheese monograph. Vol. 6. Pfizer Inc. NY.
 - 29.Sandine, W.E., P.C. Radich and. P.R. Elliker. 1972. Ecology of lactic streptococci. Review J. Milk Food Tech. 35: 176.
 - 30.Sorensen, K.I., R. Larsen, A. Kibenich,, M.P. Junge and E. Johansen. 2000. A food grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. Appl. Enviro. Microbiol. 66: 1253.
 - 31.Stainer, R.Y, M. Dondroff, and E.A. Adelberg. 1980. General Microbiology. Third edition. The whitefriars press. Ltd. London.
 - 32.Stenson, L.R. and T.R. Klaenhammer. 1986. Plasmid heterogeneity in *S.cremoris* M12R: effect of protiolytic activity and host dependent phage replication. J. Dairy Sci. 69: 2227.
 - 33.Tamime, A.Y. 1990. Microbiology of starter culture. In: Dairy Microbiology. Vol. 2. The microbiology of milk product, second edition. Robinson, R.K. ed. P.131. Elsevier Applied Science Publisher, London.
 - 34.Thomas, T.D. and O.E. Mills. 1981. Protiolytic enzyme of starter bacteria. Neth. Milk Dairy J. 35: 255.
 - 35.Tarzaghi, B. E. and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic *S.cremoris* strain HP. Neth. Milk Dairy J. 30:3.
 - 8.Fox, P.F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. J. Dairy Sci. 72 1379.
 - 9.Gasson, M.J. and F. L. Davies. 1984. The genetic of dairy lactic acid bacteria. In: Advances of microbiology and Biochemnisty of Cheese and Fermented milk.
 - 10.Grieve P.A., B.A. Lockie and J.R. Duttey. 1983. Use of *S. lactis* C2 Lac – mutant in accelerating Cheddar cheese ripening. 1- isolation , growth and properties of a C2 Lac- variants. Aust. J. Dairy Technol. 38:
 - 11.Kamaly , K.M. and E.H. Marth . 1989 . Enzyme activity of lactic streptococci and their role in maturation of cheese. A review. J. Dairy Sci. 72: 1945.
 - 12.Kok, J.1990. Gentic of proteolytic system of lactic acid bacteria. FMES. Microbiol. Rev. 87:15.
 - 13.Larson, L. D. and L.L Mckay. 1978. Isolation and characterization of plasmid DNA in *S. cremoris* . Appl. Environ. Microbiol. 36:944.
 - 14.Lawrence, R.C., T.D. Thomas and B.G. Terzagh . 1976. Reviews of the progress of dairy science: cheese starter. J. Dairy Res. 43:141.
 - 15.Limsowtin, G. K. Y., H. A. Heap and R. C. Lawrence. 1978. Heterogeneity among strains of lactic streptococci. N. Z. J. Dairy Sci. Tech. 13:1.
 - 16.Harrigan, W.F. and M.E. Mccance . 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
 - 17.Hugenholtz, J., R. Splint, W.N Koning and J. Veldkamp. 1987. Selection of proteinase positive and proteinase negative variants of *S.cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 53:309.
 - 18.Huggins, A.R. and W. E. Sandine. 1984. Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of lactic streptococci. J. Dairy Sci. 67:1674.
 - 19.Mckay, L.L., K.A. Bladwin., and F.A. Zottoia. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. Appl. Microbial 23:1090
 - 20.Mckay, L.L. and F.A. Bladwin. 1990. Applications for biotechnology: Present and future improvement in lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 87: 179.
 - 21.Orberg, P.K. and W.E Sundine. 1985. Plasmid linkage of protenase and

37. VonWright, A. and M. Sibacor. 1993. Modification of lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria P.161. Salriner, S. and vonWright, A. Eds. Marcel Dekker, Inc. NY.
- streptococci and their Bacteriophage. Appl. Environ. Microbiol. 29: 807.
36. Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. J. Dairy Sci. 76:326.